

10 / 509307

PCT/JP03/04120 27 SEP 2004

日本国特許庁 01.04.03  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 3月29日

REC'D 23 MAY 2003

出願番号

Application Number:

特願2002-095390

WIPO

[ST.10/C]:

[JP2002-095390]

出願人

Applicant(s):

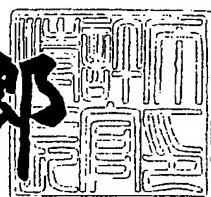
セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社  
第一製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 9日

特許長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3033413

【書類名】 特許願  
【整理番号】 NP02-1026  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61K 38/17  
【発明の名称】 c-Juinリン酸化阻害剤 (BPL1)  
【請求項の数】 17

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地  
幕張テクノガーデンD棟17階  
セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社内

【氏名】 土居 洋文

【発明者】

【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号  
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内

【氏名】 和田 直也

【発明者】

【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号  
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内

【氏名】 中島 弘人

【特許出願人】

【識別番号】 500520628  
【氏名又は名称】 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000002831  
【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088904

【弁理士】

【氏名又は名称】 庄司 隆

特2002-095390

【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 c-Junリン酸化阻害剤 (BPL1)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 BPL1からなるc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化阻害剤。

【請求項2】 BPL1の部分ペプチド、BPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、またはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであって、c-Jun N末端キナーゼ3と結合するペプチドからなるc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化阻害剤。

【請求項3】 BPL1を用いることを特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化の阻害方法。

【請求項4】 BPL1の部分ペプチド、BPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、またはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであって、c-Jun N末端キナーゼ3と結合するペプチドを用いることを特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化の阻害方法。

【請求項5】 請求項1または2に記載のリン酸化阻害剤からなるc-Junの転写活性化能の阻害剤。

【請求項6】 BPL1、またはBPL1の部分ペプチド若しくはBPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってc-Jun N末端キナーゼ3と結合するペプチド、によりc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、c-Junの転写活性化能の阻害方法。

【請求項7】 請求項1若しくは2に記載のリン酸化阻害剤、または請求項5に記載の転写活性化能の阻害剤を少なくとも1つ含有してなる医薬組成物。

【請求項8】 請求項7に記載の医薬組成物からなる、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および/または治療

剤。

【請求項9】 BPL1、またはBPL1の部分ペプチド若しくはBPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってc-Jun N末端キナーゼ3と結合するペプチドをコードするポリヌクレオチドを含んでなる、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤。

【請求項10】 前記c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である請求項8または9に記載の防止および／または治療剤。

【請求項11】 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリアル ブリティッシュ デメンチア (familial British dementia)、クロイツフェルト-ヤコブ (Creutzfeldt-Jakob) 病、ゲルストマン-ストラッスラー (Gerstmann-Strässler) 症候群、狂牛病 (ウシ海綿状脳症) (BSE)、またはニューロセルピン (neuroserpin) 封入体を伴う家族性痴呆症である請求項10に記載の防止および／または治療剤。

【請求項12】 BPL1によりc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法。

【請求項13】 BPL1の部分ペプチドまたはBPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチドまたはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってc-Jun N末端キナーゼ3と結合するペプチド、によりc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法。

【請求項14】 BPL1、またはBPL1の部分ペプチド若しくはBPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってc-Jun N末端キナーゼ3と結合するペプチド、をコードするポリヌクレオチドを用いてBPL1または当該ペプチドを発現せしめることにより、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法。

【請求項15】 請求項7に記載の医薬組成物を使用することを特徴とするc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法。

【請求項16】 前記c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である請求項12から15のいずれか1項に記載の防止および／または治療方法。

【請求項17】 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリアル ブリティッシュ デメンシア (familial British dementia)、クロイツフェルト-ヤコブ (Creutzfeldt-Jakob) 病、ゲルストマン-ストラッサー (Gerstmann-Straussler) 症候群、狂牛病 (ウシ海綿状脳症) (BSE)、またはニューロセルピン (neuroserpin) 封入体を伴う家族性痴呆症である請求項16に記載の防止および／または治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、ヒトホロカルボキシラーゼ合成酵素BPL1、またはBPL1の部分ペプチド若しくはBPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸

の変異を有するペプチド若しくはB P L 1と約70%以上の相同意を有するペプチドであってc-J u n N末端キナーゼ3（以下、J N K 3と略称する）と結合するペプチド、によりJ N K 3によるc-J u nのリン酸化を阻害することによるc-J u nの機能抑制、例えば転写活性化能抑制、これを利用したアポトーシス抑制、例えば神経細胞のアポトーシス抑制、並びに神経変性疾患などの防止および／または治療、に用いる薬剤、医薬組成物およびその方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

c-J u n N末端キナーゼ（以下、J N Kと略称する）は、M A Pキナーゼスーパーファミリーの1つである。しかしながら、J N Kは古典的M A Pキナーゼ（E R K）とは異なり、増殖刺激ではほとんど活性化せず、細胞に対するストレス、例えばD N A損傷、紫外線、熱、高浸透圧、E Rストレス、および活性酸素など並びに炎症性サイトカイン、例えば腫瘍壞死因子（T N F）やインターロイキン1など、により活性化する。

【0003】

J N Kがストレス応答により活性化され、アポトーシスに関与することは、J N Kの活性化が神経成長因子（N G F）除去による神経系細胞株P C 1 2細胞の細胞死において観察されたことなどから、従来知られていた。近年、J N Kがカスパーゼ（c a s p a s e）依存的なアポトーシスの調節に作用すること、またカスパーゼ非依存的にJ N K依存的なアポトーシスが起こることが報告されている。さらに、哺乳類において病理的（神経変性疾患）に起こる細胞死の多くが、カスパーゼ非依存的に起こることが明らかになってきた〔北中 千史ら、M o l e c u l a r m e d i c i n e (2000) 37: 408-418〕。

【0004】

アポトーシスには転写依存的な細胞死（例えば神経栄養因子除去による交感神経死やD N A損傷による死）と、転写非依存的な細胞死（例えば紫外線照射による死やF a sによる死）があるが、J N Kは両方への関与が示唆されている。転写依存的な細胞死では、J N Kがc-J u nのアミノ酸配列中第63番目および第73番目のセリン（S）をリン酸化して活性化せしめることが認められている

。例えば、c-Junのリン酸化部位をアラニン（A）に置換した変異体（A63、A73）のノックインマウスでは、カイニン酸投与による神経死が顕著に抑制された [Behrens, A. et al., Nature Genet. (1999) 21: 326-329]。c-Junはトランスアクチベーターであり、遺伝子の発現制御部位に結合して、その遺伝子の転写を促進する転写活性化能を有する。したがって、c-Junはその下流でなんらかのアポトーシス促進因子、例えばBimおよびFasLなど、の転写を誘導すると予想されている。

【0005】

現在、哺乳類には、3種類のJNK遺伝子、すなわちJNK1、JNK2、およびJNK3、が見い出されている。このうち、JNK3は脳神経系などに特異的に発現しており、低酸素状態などのショック的状況で発現して脳機能に障害を与えることが知られている。また、JNK3をノックアウトすると、カイニン酸投与による興奮性神経死が抑制されることが報告されている [Yang, D. D. et al., Nature (1997) 389: 865-870]。

【0006】

したがって、JNK3のシグナル経路を阻害することにより、JNK3のシグナル経路の異常によって引き起こされる疾患、例えば細胞のアポトーシスに基づく疾患、具体的には神経変性疾患など、の解明並びに防止および／または治療が可能になると考えられる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、JNK3のシグナル経路を阻害する物質を見い出し、JNK3のシグナル経路の異常によって引き起こされる疾患、例えば細胞のアポトーシスに基づく疾患、具体的には神経変性疾患など、の防止および／または治療手段を提供しようとするものである。

【0008】

【課題解決のための手段】

上記課題を解決すべく本発明者らは銳意努力し、JNK3と結合する蛋白質BPL1により、JNK3によるc-Junのリン酸化が阻害されることを見い出

し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち本発明は、

- (1) BPL1からなるJNK3によるc-Junのリン酸化阻害剤、
- (2) BPL1の部分ペプチド、BPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、またはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであって、JNK3と結合するペプチドからなるJNK3によるc-Junのリン酸化阻害剤、
- (3) BPL1を用いることを特徴とする、JNK3によるc-Junのリン酸化の阻害方法、
- (4) BPL1の部分ペプチド、BPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、またはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであって、JNK3と結合するペプチドを用いることを特徴とする、JNK3によるc-Junのリン酸化の阻害方法、
- (5) 前記(1)または(2)のリン酸化阻害剤からなるc-Junの転写活性化能の阻害剤、
- (6) BPL1、またはBPL1の部分ペプチド若しくはBPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と結合するペプチド、によりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、c-Junの転写活性化能の阻害方法、
- (7) 前記(1)若しくは(2)のリン酸化阻害剤、または前記(5)の転写活性化能の阻害剤を少なくとも1つ含有してなる医薬組成物、
- (8) 前記(7)の医薬組成物からなる、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤、
- (9) BPL1、またはBPL1の部分ペプチド若しくはBPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と結合するペプチドをコードするポリヌクレオチドを含んでなる、JNK3によるc-Junのリ

ン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤、

(10) 前記JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である前記(8)または(9)の防止および／または治療剤、

(11) 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリアル ブリティッシュ デメンチア(familial British dementia)、クロイツフェルト-ヤコブ(Creutzfeldt-Jakob)病、ゲルストマン-ストラッサー(Gerstmann-Strässler)症候群、狂牛病(ウシ海綿状脳症)(BSE)、またはニューロセルピン(neuroserpin)封入体を伴う家族性痴呆症である前記(10)の防止および／または治療剤、

(12) BPL1によりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法、

(13) BPL1の部分ペプチドまたはBPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチドまたはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と結合するペプチド、によりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法、

(14) BPL1、またはBPL1の部分ペプチド若しくはBPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と結合するペプチド、をコードするポリヌクレオチドを用いてBPL1または当該ペプチドを発現せしめることにより、JNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法、

(15) 前記(7)の医薬組成物を使用することを特徴とするJNK3による

c-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法、

(16) 前記JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である前記(12)から(15)のいずれかの防止および／または治療方法、

(17) 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリアル ブリティッシュ デメンシア (familial British dementia)、クロイツフェルト-ヤコブ (Creutzfeldt-Jakob) 病、ゲルストマン-ストラ恩スラー (Gerstmann-Stränsler) 症候群、狂牛病 (ウシ海綿状脳症) (BSE)、またはニューロセルピン (neuroserpin) 封入体を伴う家族性痴呆症である前記(16)の防止および／または治療方法、

からなる。

#### 【0010】

##### 【発明の実施の形態】

本発明においては、JNK3と結合するBPL1が、JNK3によるc-Junのリン酸化を用量依存的に阻害することを見い出した。すなわち、BPL1がJNK3と結合することにより、JNK3とc-Junとの相互作用が阻害され、その結果c-Junのリン酸化が阻害されると考えられる。

#### 【0011】

BPL1は、国際公開第WO01/67299号公報記載の方法によりJNK3と相互作用する蛋白質であると予測され、さらに実際の実験においてJNK3と結合することが確認された蛋白質である。

#### 【0012】

BPL1はヒドロキシカルボキシラーゼ合成酵素 (Holo carboxylase synthetase) の1つであり、カルボキシラーゼ、特にメチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ、アセチルCoAカルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、およびプロピオニルCoAカルボキシラーゼの4種の代

謝関連カルボキシラーゼ、にビオチンを結合させ活性化させる機能を有する [Nippón Rinsho (1996) 54 (1) : 259-267]。当該酵素の欠損は、ホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症を引き起こす。ホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症は複数のカルボキシラーゼの活性低下を反映した多彩な生化学的異常、臨床症状を示す常染色体劣性の先天性代謝異常症である [Nippón Rinsho (1996) 54 (1) : 259-267]。

【0013】

ヒトBPL1のcDNAは既にクローニングされている [Suzuki, et al., Nature Genet. (1994) 8 (2) : 122-128]。したがって、BPL1は、当該cDNAの情報に基づいて、公知の遺伝子工学的手法により得ることが可能である。例えば、上記ポリヌクレオチドの情報にしたがって設計し公知の方法で合成したプライマーを用いて、例えばヒト脳由来cDNAライブラリーを用いて目的の遺伝子を増幅し、発現ベクターに挿入して宿主細胞に導入し、BPL1を発現する細胞を構築し、当該細胞から公知の方法で蛋白質を抽出して精製することにより得られる。また、公知の無細胞蛋白質合成系を利用して合成することも可能である。

【0014】

一方、JNK3によるc-Junのリン酸化はアポトーシス、例えば神経細胞死に関与していることが報告されている [Behrens, A. et al., Nature Genet. (1999) 21: 326-329]。また、c-Junはトランスアクチベーターであり、遺伝子の発現制御部位に結合して当該遺伝子の転写を促進する転写活性化能を有し、そのシグナル経路の下流でなんらかのアポトーシス促進因子、例えばBimおよびFasLなど、の転写を誘導すると予想されている。

【0015】

これらから、BPL1を用いてJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することにより、c-Junの転写活性化能を抑制することができ、さらにはJNK3によるc-Junのリン酸化により引き起こされる生理的現象、例えばアポトーシスを抑制することが可能と考えられる。

## 【0016】

また、BPL1の部分ペプチドであってJNK3とBPL1との結合部位を含むペプチドのうちJNK3と結合し得るペプチドは、JNK3とc-Junとの相互作用を阻害できるため、JNK3によるc-Junのリン酸化阻害に利用できる。本発明において部分ペプチドとは、当該部分ペプチドを含有するペプチドのアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチドのことを意味する。また、BPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸に変異、例えば置換、欠失、付加、または挿入など、を有するアミノ酸配列からなるペプチド、あるいはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであって、JNK3と結合し得るペプチドも、JNK3によるc-Junのリン酸化阻害に利用できる。上記ペプチドは、その性質として、JNK3とBPL1との結合を阻害し得る。かかるペプチドは、BPL1のアミノ酸配列に基づいて設計して自体公知の方法で合成し、JNK3とBPL1との結合、例えばBPL1のリン酸化、を指標にして阻害作用を確認することにより得ることができる。また、上記変異が導入されたペプチドは自体公知の手段、例えば部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはポリメラーゼ連鎖増幅法（PCR）を単独または適宜組み合わせて、例えばサムブルック等編【モレキュラークローニング、アラボラトリーマニュアル 第2版】コールドスプリングハーバーラボラトリー、1989、村松正實編【ラボマニュアル遺伝子工学】丸善株式会社、1988、エールリッヒ、H.E. 編【PCRテクノロジー、DNA增幅の原理と応用】ストックトンプレス、1989等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して利用することにより得ることができる。例えばUlmmerの技術（Science, 219, 666, 1983）を利用することができます。このような変異の導入において、当該ペプチドの基本的な性質（物性、活性、または免疫学的活性等）を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸等）の間での相互置換は容易に想定される。

## 【0017】

ここでペプチドとは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を意味し、オリゴペプチド、ポリペプチド、蛋白質を包含する。以降、アミノ酸を表記する場合、1文字にて表記することがある。

【0018】

上記発見に基づいて、本発明において、BPL1、またはBPL1の部分ペプチド若しくはBPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と結合するペプチド、からなるJNK3によるc-Junのリン酸化阻害剤、当該リン酸化阻害剤からなるc-Junの転写活性化能の阻害剤、当該リン酸化阻害剤または当該転写活性化能の阻害剤を少なくとも1つ含有してなる医薬組成物、BPL1または上記ペプチドを用いることを特徴とするJNK3によるc-Junのリン酸化の阻害方法、並びにBPL1または上記ペプチドによりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とするc-Junの転写活性化能の阻害方法が提供可能である。これらは、JNKのシグナル経路およびその機能を解明するための試薬として有用である。

【0019】

本明細書において、c-Junの転写活性化能の阻害剤とは、c-Junの特定DNA配列への結合、c-Junと協同して転写を行う他因子との結合など、c-Junを含む転写活性装置になんらかの形で作用することにより、最終的にc-Junが関与する転写活性を阻害するものを意味する。

【0020】

JNKシグナル経路が、ポリグルタミン病による細胞死のモデル系においてポリグルタミンを含む凝集体の中で活性化していること、またポリグルタミンによる細胞死をMKK4（JNKシグナルにおいてJNKの上流に位置し、JNKをリン酸化して活性化せしめるMAPキナーゼキナーゼ4）やc-Junのドミニントネガティブ変異体が抑制することが報告されている[Yasuda, S. et al., Genes to Cells (1999) 4: 734-756]。さらに、アルツハイマー病の原因遺伝子アミロイド・プレカーサー・プロテイ

ン（A P P）の切断産物アミロイド $\beta$ による細胞死にJ N Kが関与することも示されている〔浦 誠司ら、実験医学（2001）19：1839-1844〕。

【0021】

これらから、B P L 1、またはB P L 1の部分ペプチド若しくはB P L 1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはB P L 1と約70%以上の相同意を有するペプチドであってJ N K 3と結合するペプチド、を用いてJ N K 3によるc-J u nのリン酸化を阻害することにより、J N K 3によるc-J u nのリン酸化が係るアポトーシスに基づく疾患、例えば神経変性疾患など、の解明並びに防止および／または治療が可能になると考えられる。神経変性疾患としては、次に挙げる例に限定されるものではないが、ポリグルタミン病（例えばハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、および歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症など）、並びにアルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、L e w y 小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、p i c k 病、ファミリアルブリティッシュ デメンチア（f a m i l i a l B r i t i s h d e m e n t i a）、クロイツフェルト-ヤコブ（C r e u t z f e l d - J a k o b）病、ゲルストマン-ストラッサー（G e r s t m a n n - S t r a n s s l e r）症候群、狂牛病（ウシ海綿状脳症）（B S E）、およびニューロセルピン（n e u r o s e r p i n）封入体を伴う家族性痴呆症などが挙げられる。上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、または上記医薬組成物は、上記疾患の防止および／または治療剤、並びにこれらを用いることを特徴とする上記疾患の防止および／または治療方法に使用できる。

【0022】

また、蛋白質発現用のベクターやトランスポーターを用いて、B P L 1、またはB P L 1の部分ペプチド若しくはB P L 1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはB P L 1と約70%以上の相同意を有するペプチドであってJ N K 3と結合するペプチド、をコードするポリヌクレオチドをインビボで発現させてJ N K 3によるc-J u nのリン酸化を阻害し、上記疾患を防止および／または治療することも可能である。B P L 1または

上記ペプチドのインビボでの発現は、公知の方法を利用して実施できる。例えばBPL1または上記ペプチドをコードするポリヌクレオチドを処理加工して、核酸ベクター、例えば複製欠損レトロウイルスベクターなど、に挿入して対象の細胞中に送達することにより可能である。したがって、BPL1または上記ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤も本発明の範囲に含まれる。

【0023】

上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の処方および投与形態は、適当な医薬担体と組み合わせて処方することが好ましい。かかる処方は、治療上有効量の上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤、さらに医薬上許容される担体または賦形剤を含む。かかる担体としては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限らない。処方は投与経路に適したものを選択すればよく、該処方は当業者によく知られている。

【0024】

上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の処方および投与形態は、単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物と一緒に使用してもよい。上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の全身投与の好ましい一態様は、注射、例えば静脈注射が挙げられる。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることもできる。投与の別の態様は、腸溶処方またはカプセル処方がうまく処方されるならば、経口投与も可能である。さらに、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜または経皮投与を用いることもできる。投与は局所的なものであってもよく、膏薬、パスタ、ゲルなどの形態での投与であってもよい。

【0025】

必要な用量範囲は、上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の有効性、投与経路、処方の性質、対象の症状の性質、および担当医師の判断による。具体的には、適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり0.1ないし100μgの範囲である。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のため的一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

【0026】

製剤化にあたっては蛋白質など各対象の物性に応じた公知の製剤化手段を導入すればよい。具体的には例えば、散剤、丸剤、錠剤、カプセル製剤、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、リポソーム製剤、脂肪乳剤、シクロデキストリンなどの包接体などの製剤化方法が利用できる。

【0027】

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュークロース、マンニトールなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体が用いられる。

【0028】

懸濁剤は、水、シュークロース、ソルビトール、フラクトースなどの糖類、PEGなどのグリコール類、油類を使用して製造できる。

【0029】

注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液または、塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

【0030】

リポソーム化は例えば、リン脂質を有機溶媒（クロロホルムなど）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振盪、超音波処理および遠心分離した後、上清を濾過処理して回収することにより行い得る。

【0031】

脂肪乳剤化は例えば、当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油などの植物油、MCTなど）、乳化剤（リン脂質など）などを混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば、高圧噴射型、超音波型など）を用いて、乳化・均質化処理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えば、グリセリン、糖類（例えば、ブドウ糖、ソルビトール、果糖など）が例示される。

【0032】

シクロデキストリン包接化は例えば、当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水などに加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿を濾過し、滅菌乾燥することにより行い得る。この際、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 型）を適宜選択すればよい。

【0033】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【実施例1】

（JNK3と相互作用する蛋白質のインシリコでの探索）

JNK3と相互作用する蛋白質を、国際公開第WO01/67299号公報に記載の予測方法にしたがってインシリコで予測した。すなわち、JNK3のアミノ酸配列をある長さのオリゴペプチドに分解し、各オリゴペプチドのアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を持った蛋白質をデータベース中で検索し、得られた蛋白質とJNK3との間でローカルアライメントを行い、ローカルアライメントのスコアの高いものをJNK3と相互作用すると予測した。ここではローカルアライメントのスコアを、国際公開第WO01/67299号公報に記載の方法と同様に、25.0以上とした。また、JNK3は脳神経系に特異的に発現する蛋白質であり、低酸素状態などのショック的状況で発現し

脳機能に障害を与えることが分かっているので、JNK3と相互作用する蛋白質の候補は、脳で発現し重要な機能を持っている既知の蛋白質に絞った。

【0034】

この結果、JNK3由来の6アミノ酸残基からなるオリゴペプチドLPPSSSおよびANLCQVと相同性あるオリゴペプチドLPPSSNおよびAVLCQVが、ホロカルボキシラーゼ合成酵素であるBPL1のアミノ酸配列中に存在することが分かった。図1に、JNK3とBPL1とのローカルアライメントの結果を示した。ローカルアライメントにおいて25.0以上のスコアを示すフレグメントは、JNK3とBPL1との間で9個見い出された。この結果から、JNK3とBPL1は相互作用する蛋白質であることが予測された。

【0035】

(JNK3によるc-Junのリン酸化に対するBPL1の作用解析)

<材料>

活性化型ヒトJNK3は、N末端ヒスチジンタグ(His-tag)付加蛋白質(His-JNK3)として調製した。まず、ヒト海馬cDNAライブラリーを鑄型として逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により得たヒトJNK3(JNK3 $\alpha$ 1)cDNAを、pFASTBAC HT (Invitrogen社)に挿入し、添付の説明書に従い、His-JNK3発現用組換えバキュロウイルスを作製した。次に、作製した組換えウイルスをSf9細胞に感染させてHis-JNK3を発現させ、プロボンドレジン(Probond Resin) (Invitrogen社)で精製して使用した。

【0036】

c-Jun(1-79)(c-JunのN末端79アミノ酸領域であり、JNKによるリン酸化部位を含む)は、N末端グルタチオン-Sトランスフェラーゼ(GST)融合蛋白質(以下、GST-c-Jun(1-79))として大腸菌にて発現後、グルタチオンセファロース4B(Glutathione sepharose 4B) (Amersham Pharmacia biotech社)で精製して使用した。

【0037】

ヒトBPL1は、N末端GST融合蛋白質（以下、GST-BPL1）として大腸菌にて発現後、Glutathione sepharose 4B (Amersham Pharmacia biotech社)で精製して使用した。すなわち、まず、C末端V5/His-tag付加ヒトBPL1発現プラスミド、pcDNA3.1-BPL1/V5-His (Invitrogen社)からBPL1のオープンリーディングフレーム(ORF)領域をPCRにより増幅後、pGEX-4T (Amersham Pharmacia biotech社)に挿入し、大腸菌(E. coli)用GST-BPL1発現ベクターを構築した。

【0038】

次に、上記発現ベクターを導入したE. coli BL21株を100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLB培地中にて37℃にて培養後、イソプロピル-1-チオ- $\beta$ -D-ガラクトシド(IPTG)を終濃度0.1mMとなるように添加し、さらに25℃にて培養後、菌体を回収した。この菌体から、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含むTGEDSバッファー[50mM Tris-HCl, pH 8.0/0.2mM EDTA/1mM デチオスレイトール(DTT)/150mM NaCl/10% グリセロール(glycerol)]を用いて、抽出液を調製し、Glutathione sepharose 4BによりGST-BPL1を精製した。精製したGST-BPL1はTGEDSバッファーで透析後に使用した。

【0039】

<インビトロ リン酸化実験(in vitro kinase assay)>

1 $\mu$ gの各GST融合タンパク質(GST-BPL1, GST-c-Jun(1-79)またはGST)と活性化型JNK3(0.14、28または70ng)を、5 $\mu$ Ciの[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP(アデノシン三リン酸)(3000Ci/mmol, NEN社)を含むカイネーションバッファー(kinase buffer)(25mM Tris-HCl, pH 7.5/5mM  $\beta$ -グリセロフォスファート(glycerophosphate)/2mM DTT

/0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>/10 mM MgCl<sub>2</sub>/10 μM ATP) 中にて30℃で30分間インキュベーションすることにより、リン酸化反応を行った。反応後、等量の2×SDS サンプルバッファー [4% SDS/125 mM Tris-HCl, pH 6.8/20% glycerol/0.01% ブロムフェノールブルー (B P B) /10% β-メルカプトエタノール (mercaptoethanol)] を加え、100℃で5分間処理した後、5-20% SDS-PAGEにより蛋白質を分離し、BAS2000 (Fuji film社) を用いたオートラジオグラフィーによりリン酸化蛋白質を検出した。

## 【0040】

次に、1 μgのGST-c-Jun (1-79) と活性化型JNK3 (70 ng) を、GSTまたはGST-BPL1 (共に1 μgまたは2 μg) の存在下または非存在下で、5 μCiの[γ-<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol, NEN社) を含むカイネーションバッファー中にて、30℃で30分間インキュベーションすることにより、リン酸化反応を行った。反応後、等量の2×SDS サンプルバッファーを加え、100℃で5分間処理した後、上清を10% SDS-PAGEにより分離し、1次抗体として抗リン酸化c-Jun (S63) 抗体 (anti-Phospho-c-Jun (S63) antibody) (New England Biolabs社) を、2次抗体としてホースラディッシュ・パーオキシダーゼ結合抗ウサギIgG抗体 (HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody) (Amersham pharmacia biotech社) を用いたイムノブロッティングによりリン酸化されたGST-c-Jun (1-79) を検出した (図2)。検出にはECLウエスタンブロッティング・ディテクション・キット (Amersham pharmacia biotech社) を使用した。さらに、検出されたリン酸化GST-c-Jun (1-79) のバンド強度を画像解析ソフト、Intelligent Quantifier (Bio Image社) を用いて定量し、GSTまたはGST-BPL1存在下でのバンド強度を、非存在下での強度を100%としたときの相対強度で示した (表1)。

## 【0041】

## &lt;結果&gt;

JNK3によりGST-BPL1のリン酸化が認められた。また、このリン酸化がJNK3の用量依存的であったことから、GST-BPL1のリン酸化は自己リン酸化ではなくJNK3によるものであることが明らかになった。このことから、JNK3とBPL1とが相互作用することが判明した。

## 【0042】

図2および表1に示したように、1μgまたは2μgのGST-BPL1の存在下では、JNK3によるGST-c-Jun(1-79)のリン酸化がそれぞれ約20%または約40%阻害された。一方、GST存在下ではJNK3によるGST-c-Jun(1-79)のリン酸化に変化はなかった。これらから、JNK3によるGST-c-Jun(1-79)のリン酸化がBPL1により用量依存的に阻害されることが明らかになった。

## 【0043】

【表1】

添加した蛋白質	添加量(μg)	相対強度(%)
なし		100
GST	1.0	92.7
	2.0	93.6
GST-BPL1	1.0	81.6
	2.0	59.7

## 【0044】

## 【発明の効果】

本発明においては、JNK3と結合する蛋白質BPL1によって、JNK3によるc-Junのリン酸化が阻害されることを初めて見い出した。c-Junは

トランスクレッセーターであり転写活性化能を有することが知られている。また、神経細胞死が認められる疾患、例えばポリグルタミン病やアルツハイマー病、においてJNK3の関与が認められている。したがって、BPL1を用いてJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することにより、c-Junの転写活性化能を抑制することができ、さらにはJNK3によるc-Junのリン酸化により引き起こされる生理的現象、例えばアポトーシスを抑制することが可能と考えられる。

これらのことから本発明は、BPL1、またはBPL1の部分ペプチド若しくはBPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と相互作用するペプチド、によりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とするc-Junの機能抑制、例えば転写活性化能抑制、これを利用したアポトーシス抑制、例えば神経細胞のアポトーシス抑制、並びに神経変性疾患など、例えばポリグルタミン病やアルツハイマー病など、の防止および／または治療、に用いる薬剤、医薬組成物およびその方法を提供可能であり、またJNKシグナル経路およびその機能の研究のために非常に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 JNK3とBPL1との相互作用をインシリコで予測した結果を示す図面である。

【図2】 JNK3によるc-Junのリン酸化をBPL1が阻害することを示す図面である。レーン1は、JNK3によるc-Jun(1-79)のリン酸化反応に他の蛋白質を無添加のとき、レーン2および3はGSTをそれぞれ1  $\mu$ gおよび2  $\mu$ g、レーン4および5はGST-BPL1をそれぞれ1  $\mu$ gおよび2  $\mu$ g添加したときの結果を示す。矢頭はリン酸化されたc-Jun(1-79)を示す。

【書類名】 図面

【図1】

>Score = 30.9

167 SYLLYQML  
216 SYI LYHLL  
SY LY L

>Score = 29.6

140 QDVYLVMELMDAN  
9 RBXYLASELIGAS  
YL EL A

>Score = 27.7

10 SEPTLDVK  
67 PEPSLEIK  
EP L K

>Score = 28.2

186 IHRDLKPSNIVVKS  
355 VHLELPPSSNIVQT  
H L PS V

>Score = 26.2

133 QKTLEEFQD  
667 EKL IKEFQD  
K EFQD

>Score = 26.8

150 DANLCQVIGMEL  
349 EA VLCQV-HILEL  
A LCQV EL

>Score = 27.1

427 LPPSSSV  
359 LPPSSNI  
LPPSS

>Score = 25.1

132 PQKTLEEFQDVYLVM  
194 SQEALGRFHEVRSLV  
Q L F V V

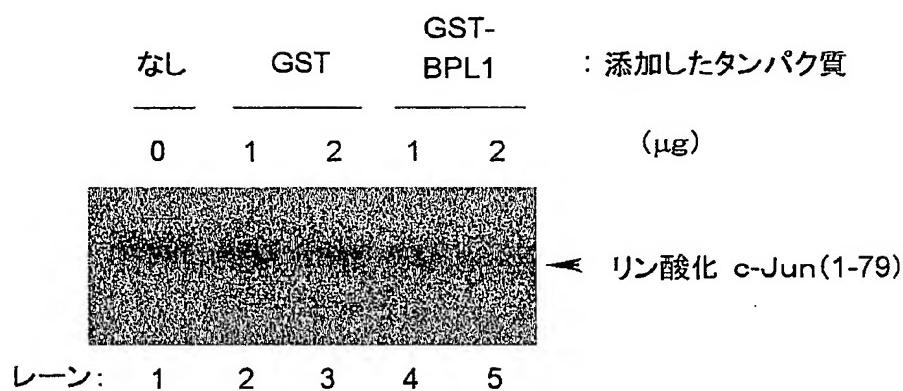
>Score = 25.1

134 KTLEEFQDVYL  
576 RSIPEYQDINL  
E QD L

BEST AVAILABLE COPY

特2002-095390

【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 JNK3シグナル経路の阻害物質を見い出し、JNK3シグナル経路の異常に基づく疾患、例えば細胞のアポトーシスに基づく神經変性疾患などの疾患、の防止および／または治療手段を提供すること。

【解決手段】 BPL1、またはBPL1の部分ペプチド若しくはBPL1のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド若しくはBPL1と約70%以上の相同性を有するペプチドであってJNK3と結合するペプチド、によりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とするc-Junの機能抑制、例えば転写活性化能抑制、これを利用したアポトーシス抑制、例えば神經細胞のアポトーシス抑制、並びに神經変性疾患など、例えばポリグルタミン病やアルツハイマー病などの防止および／または治療、に用いる薬剤、医薬組成物およびその方法。

【選択図】 なし

特2002-095390

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-095390
受付番号	50200457003
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 4月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 3月29日

次頁無

特2002-095390

認定・付加情報

特許出願の番号 特願2002-095390  
受付番号 50200457003  
書類名 特許願  
担当官 鎌田 柴規 8045  
作成日 平成15年 4月 8日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 3月29日

次頁無

特2002-095390

出願人履歴情報

識別番号 [500520628]

1. 変更年月日 2000年10月26日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD  
17

氏 名 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

特2002-095390

出願人履歴情報

識別番号 [000002831]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋3丁目14番10号  
氏 名 第一製薬株式会社